

don Montpelliér 1968

Michel FOSSET et André CRASTES DE PAULET

**Contribution à l'étude du site actif
de la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase
de «Pseudomonas testosteroni»**

T

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER

1967

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU SITE ACTIF DE LA 3 (OU 17)- β -HYDROXYSTÉROÏDE : NAD OXYDORÉDUCTASE DE *PSEUDOMONAS TESTOSTERONI* (*).

par Michel FOSSET (**) et André CRASTES DE PAULET.

Groupe de Recherches sur la Biochimie des Stéroïdes-(INSERM U 58)
Institut de Biologie, Faculté de Médecine, 34-Montpellier.

(Mémoire reçu le 3 avril 1967).

Résumé. — Nous avons étudié l'action de la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *Pseudomonas Testosteroni* sur un groupe de stéroïdes 17 β -hydroxylés et sur quelques composés polycyclaniques : tous ces substrats ont été choisis de sorte que l'environnement immédiat de la fonction alcool secondaire oxydée par l'enzyme soit le même que celui de la jonction C-D trans hydrindane de la testostérone ; cette condition permet d'étudier l'effet sur la cinétique d'oxydation, caractérisée par la vitesse maximum d'oxydation V et par Km, des modifications de structure *distantes* de la fonction oxydée, par exemple sur le noyau A ou B.

Deux groupes de faits expérimentaux ont été mis en évidence : en l'absence de fonction ou groupement polaire sur le noyau A, l'oxydation en C₁₇ est très lente. On sait, depuis les travaux de TALALAY que cette vitesse croît lorsque le noyau A porte une fonction carbonylée ; nos résultats montrent que, de façon plus générale, un effet d'accélération est obtenu lorsque le noyau A porte une fonction ou groupement polaire (—C=C—, i-stérol, C—Cl, C—F).

L'extension des dimensions du substrat au niveau du noyau A diminue progressivement V qui s'annule par exemple lorsqu'une longue chaîne *flexible* à 9 atomes est substituée en C₂₅, ou qu'un cycle *rigide* est fermé sur C₂-C₃, ceci même si la molécule porte de nombreux groupements polaires sur le noyau A et le cycle surnuméraire.

Par contre, l'enzyme s'« adapte » parfaitement à des substrats tricycliques : les A- des stéroïdes sont d'excellents substrats.

Nous avons tenté d'étendre à ce type d'enzyme et de substrats la théorie proposée par PRELOG pour analyser et expliquer la stéréospécificité d'action d'oxydoréductases fongiques ou tissulaires sur des alcools ou des cétones mono, bi ou tricycliques.

La superposition sur la liaison C₁₇-OH de tous les substrats s'oxydant à une vitesse supérieure ou égale à celle du 17 β -hydroxy(5 α) androstane conduit ainsi à un « moulage » du site enzymatique.

Ce procédé d'analyse indirecte du site enzymatique permet d'évaluer ses dimensions, suggère la participation de sites « secondaires » fixant la molécule par liaison avec des régions polaires du noyau A, et détermine une « orientation » de ce site qui met en évidence des « régions interdites ».

Ce modèle théorique du site enzymatique permet de faire des prévisions satisfaisantes sur la vitesse d'oxydation d'un substrat.

(*) Travail réalisé dans le cadre de la R.C.P. n° 70 avec l'aide technique de Mme Colette STAUB (***) et présenté au 2^e Congrès International sur les stéroïdes hormonaux, Milan 23-28 Mai 1966.

(**) Attaché de Recherches au C.N.R.S.

(***) Technicienne INSERM.

La stéréospécificité d'action de nombreux enzymes bactériens ou tissulaires sur des structures de type stéroïde est un fait expérimental bien connu. Il s'agit d'une « stéréospécificité du produit » de réaction, souvent réversible, associant par exemple un carbone « méso » [1] à un carbone asymétrique porteur d'un hydroxyle de configuration *S* ou *R*. Telles sont l'hydroxylation stéréospécifique des stéroïdes ($\text{---CH}_2\text{---} \rightleftharpoons \text{CHOH}$) et l'oxydoréduction des stéroïdes oxygénés ($\text{---CO---} \rightleftharpoons \text{---CHOH---}$ [2]). Ce deuxième type de réaction est réglé par des oxydoréductases NAD ou NADP dépendantes.

Les oxydoréductases spécifiques des composés oxygénés à structures cyclaniques et polycyclaniques ont été particulièrement étudiées par TALALAY [3, 4, 5, 6, 7], par RINGOLD [8, 9, 10], par THEORELL [11], par PRELOG [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. Ce dernier auteur, en particulier, au terme d'une étude extrêmement méthodique de la stéréospécificité d'action d'oxydoréductases fongiques (*Curvularia*, *Mucor*) ou tissulaires sur des composés mono, bi ou tricyclohexaniques, a proposé d'attribuer la stéréospécificité observée aux résultats d'une orientation *constante* du substrat par rapport à une face de la molécule de nicotinamide du coenzyme. Il en résulte la possibilité d'obtenir par voie « indirecte » des renseignements sur la géométrie du site enzymatique.

Nous nous sommes demandé si cette théorie pouvait être étendue aux hydroxystéroïdes oxydoréductases.

Nous avons choisi pour un premier travail la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *P. testostérone* de préférence à une oxydoréductase tissulaire. Les raisons de ce choix sont multiples :

1. la spécificité de cet enzyme a déjà fait l'objet d'études avancées par le groupe de TALALAY. Nous bénéficions donc d'éléments de comparaison.

2. Il possède une bi-spécificité en C_3 et C_{17} qui ne présentent ni le 3 α -enzyme [19, 20] de cette même bactérie, ni par exemple la 17 β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase placentaire humaine [21, 22].

3. Cet enzyme peut être obtenu en grande quantité avec un degré de pureté élevé.

4. Il est *inductible* et de ce fait il est intéressant de rechercher des corrélations entre les configurations et la conformation des « bons substrats » et des « bons inducteurs ».

L'objet de ce premier travail est de présenter et de discuter les résultats de l'étude par voie indirecte de cet enzyme bactérien.

I. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1. — Réactifs.

a) Réactifs utilisés pour la purification de l'enzyme et les mesures de cinétiques enzymatiques.

— *Solution E* : tampon phosphate (pH 7,2) contenant 0,0206 M de PO_4HK_2^* et 0,0094 M de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ et 0,001 M EDTA^* .

— *Solution M* : tampon pyrophosphate (pH 9,50) contenant 0,1 M de $P_2O_7Na_4$, 10 H_2O^+ et 0,1 M de $PO_4H_2K^+$.

— *Solution MS* : solution M additionnée de sérum albumine bovine à 1 p. 1000.

— CO_3HNa^+ et $SO_4(NH_4)_2^+$ recristallisé deux fois dans l'eau distillée.

— Le Dioxane* est fraîchement redistillé sur SO_4Fe . Tous les réactifs avec (*) sont des réactifs MERCK pour analyses.

— β -NAD (Sigma Chemical Company, Grade III).

— Sérum albumine bovine (Sigma Chemical Company).

b) Stéroïdes.

L'inducteur utilisé est la testostérone Roussel-Uclaf. La provenance des différents stéroïdes essayés est indiquée en fin de texte.

2. — Matériel.

La destruction des parois bactériennes est réalisée au moyen d'un appareil à ultra-sons, type Sonifier Branson.

Les mesures d'activités enzymatiques sont effectuées sur un spectrophotomètre ZEISS PMQ II équipé d'un enregistreur Linecomp.

3. — Techniques.

a) Induction et purification du β -enzyme.

L'induction de la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase (EC 1.1.1.51) a été réalisée par le Dr MICHEL-BRIAND et fera l'objet d'une communication ultérieure. Nous décrivons cependant les principales étapes de la méthode.

La bactérie *Pseudomonas Testostéroni* (ATCC n° 11 996) est cultivée sur milieu d'extrait de levure, l'inducteur étant ajouté en début de croissance exponentielle à une concentration de $1,7 \cdot 10^{-3}$ M. Après 12 h, la suspension bactérienne est centrifugée, lavée avec la solution E.

TABLEAU I.

Principales étapes de la purification de la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *P. Testostéroni*.

Etapes	Activité spécifique (unités/mg protéines)
Extrait brut bactérien (bactéries "sonnées" au Sonifier)	0,4
Précipitation par $SO_4(NH_4)_2$ 0,20 S (élimination des acides nucléiques et d'une fraction des protéines neutres)	0,8
Précipitation de la fraction ayant l'activité " β " par $SO_4(NH_4)_2$ entre 0,20 S et 0,40 S	2,4
Filtration sur Séphadex G-100 et recyclage (1 cycle)...	30

La filtration sur Séphadex G-100 a été réalisée sur une colonne « Pharmacia » de $100 \times 2,5$ cm avec la solution E comme tampon d'élution.

La capacité maximum de la colonne est de 30 mg de protéines dans 2 ml de tampon. Toutes les purifications sont faites à 4°C.

Les bactéries sont lysées par ultra-sons (20 Kc-5 mn). L'homogénat est ensuite purifié selon une méthode analogue à celle de DELIN, SQUIRE et PORATH [23]. Le Tableau I indique les principales étapes de la purification.

b) Mesure de l'activité enzymatique des fractions isolées.

On définit l'activité spécifique (unités par mg de protéines) comme la quantité d'enzyme qui, oxydant le 3-oxo-17 β -hydroxy androsta-1,4-diène provoque la formation de 1 μ M de NADH par minute à pH 9,50 et à une température de 25°C dans une cuve de 1 cm de chemin optique contenant par ordre d'addition :

- 2 ml de solution M
- 0,5 mg de NAD (dissous dans 500 μ l d'eau neutralisés par CO_3HNa)
- 0,12 μ M (10 μ l d'une solution 0,012 M dans le dioxane) de 3-oxo 17 β -hydroxy androsta-1,4-diène.
- H_2O q.s.p. 3 ml.

Ces conditions ont été choisies de manière à réaliser une concentration finale en stérol de $4 \cdot 10^{-5}$ M dans un volume total de 3 ml. Les solutions de NAD, eau, tampon, sont préthermorégulées à 25°C. La réaction est déclenchée par l'addition de l'enzyme (10 à 100 μ l).

La cuve témoin (si nécessaire) contient les mêmes réactifs, seul le stérol a été remplacé par 10 μ l de dioxane pur.

Ces conditions de mesure réalisent des taux de NAD et de stérol en concentration saturante pour l'enzyme : les vitesses initiales obtenues sont alors maximales et proportionnelles aux quantités d'enzyme introduites : la cinétique est d'ordre zéro.

c) Dosage des protéines totales. Il est réalisé par la méthode de LOWRY [24].

d) Les mesures des cinétiques d'activité enzymatique pour différents stérols posent des problèmes particuliers :

1. La nécessité d'effectuer des mesures cinétiques pour de faibles concentrations en substrat, (de l'ordre de 10^{-5} M) impose l'utilisation de cuves de 5 cm de chemin optique : l'enregistrement des vitesses initiales peut alors être réalisé avec un maxima de précision (± 5 p. 100).

L'usage de telles cuves implique la multiplication de tous les volumes définis dans le paragraphe b par un facteur 3.

Toutes les cinétiques sont réalisées pendant un temps de 50 à 100 secondes suivant l'addition de l'enzyme.

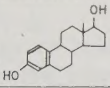
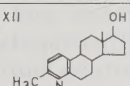
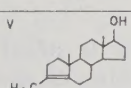
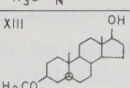
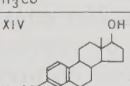
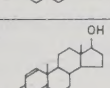
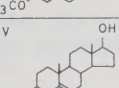
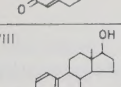
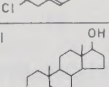
2. Certains substrats sont imparfaitement solubles dans les conditions normales de mesure : ils doivent être préalablement solubilisés comme suit :

Le stérol en solution dans le dioxane est agité pendant 2 h à 25°C dans la solution MS et filtré sur papier. La concentration en stérol « libre » de la solution homogène ainsi obtenue (solution S) est déter-

minée par oxydation enzymatique en présence d'un excès d'enzyme : TALALAY [25] a en effet montré qu'à pH 9,50 l'oxydation des 17 β -hydroxystéroïdes est quantitative en trois minutes, en présence d'un excès d'enzyme ; la réaction d'oxydoréduction se faisant mole pour mole, la concentration molaire en stérol est égale à la concentration molaire en NADH formé ($\epsilon_{340\text{ m}\mu}^{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [26]).

La quantité de stérol « lié » à la sérum albumine peut être considérée comme négligeable. L'exemple de la testostérone permettra de fixer l'ordre de grandeur de cette fraction liée : la capacité de fixation de la

TABLEAU II.
*Oxydation de quelques 17 β -OH stéroïdes
par la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase
de P. Testosteroni.*

SUBSTRATS	V	Km.10 ⁻⁵ M	SUBSTRATS	V	Km.10 ⁻⁵ M
I 	19	0,9	IX 	143	0,2
II 	13	< 0,1	X 	148	0,6
III 	43	1,7	XI 	158	4,2
IV 	53	0,8	XII 	161	0,3
V 	47	1,1	XIII 	168	1,7
VI 	81	0,8	XIV 	206	0,2
VII 	98	0,3	XV 	260	4,6
VIII 	94	3,4	XVI 	300	2,8

Les stéroïdes I, II, III, IV, VIII, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, ont été solubilisés dans la sérum albumine comme indiqué dans le texte.

testostérone par la sérum albumine a été déterminée par méthode de dialyse à l'équilibre par PEARLMAN et CREPY [38] ; ces auteurs trouvent un rapport stérol lié/sérum albumine exprimé en mole pour mole, de $0,513 \cdot 10^{-5}$ pour des conditions réalisant 50 p. 100 de liaison du stéroïde.

Cette valeur aussi faible nous permet d'évaluer à moins de un nanogramme la quantité de testostérone fixée par la sérum albumine dans les conditions expérimentales que nous utilisons. Cette valeur est négligeable dans nos mesures de cinétiques enzymatiques. Ceci est confirmé par les valeurs de vitesses initiales d'oxydation obtenues avec la testostérone, le 3-oxo 17 β -hydroxy androsta-1,4-diène et les stéroïdes XXVII et XXVIII, tous substrats parfaitement solubles : nous avons constaté que l'addition de sérum albumine ne modifiait pas leur vitesse d'oxydation initiale, quel que soit le domaine de concentration en stéroïde utilisé, et alors même que la concentration en sérum albumine était élevée à 1 p. 100, soit dix fois celle utilisée dans le protocole de mesure habituel.

Les stérols parfaitement solubles sont directement ajoutés à la cuve de mesure, en solution dans le dioxane (5 à 60 μ l selon la quantité de stérol introduite).

3. Au cours de toutes ces mesures, le maintien d'une force ionique et d'une concentration en sérum albumine constante malgré la variabilité du volume de solution S introduite, sont réalisées par addition de solution MS.

4. Expression des résultats.

Les vitesses d'oxydation initiales (v) sont exprimées en valeur relative par rapport à la vitesse d'oxydation de la testostérone prise égale à 100 à une concentration de 6.10^{-6} M. Ce mode d'expression arbitraire n'est justifié que par la nécessité de pouvoir comparer dans notre travail, nos résultats à ceux de TALALAY, qui utilise précisément ce système d'expression « relative ». Ces vitesses sont portées graphiquement selon la représentation d'EADIE [27]. L'extrapolation pour $[S] = 0$ de la droite $v = f(V/[S])$ détermine la vitesse initiale maximum V . La pente de la droite donne la constante de MICHAELIS K_m .

Ce mode de représentation permet de vérifier que le stérol étudié est sous forme de solution moléculaire dans tout le domaine de concentration utilisé ; l'apparition d'un état micellaire doit se traduire par une rupture de linéarité du système de représentation d'EADIE. Cette remarque concerne les stérols solubilisés en présence de sérum albumine. Elle ne doit pas prêter à confusion avec les anomalies observées pour les stérols solubles présentant l'inhibition par excès de substrat.

II. — RÉSULTATS.

A. La figure 1 groupe une première série de mesures cinétiques sur 16 stéroïdes 17 β -hydroxylés ne différant que par la structure et la nature des substitutions du noyau A. Leurs formules sont représentées dans le Tableau II. L'examen de la Fig. 1 montre que tous ces stéroïdes ont une cinétique d'oxydation michaelienne. Pour aucun d'entre eux, n'est observée l'inhibition par excès de substrat. On est donc en droit de comparer leur vitesse d'oxydation V et leur K_m figurant dans le tableau II. On constate ainsi que :

1. V est faible en l'absence de toute substitution du noyau A.
2. L'introduction d'une double liaison éthylénique en différentes positions du noyau A (stéroïls III, IV) ou d'un « équivalent » de double liaison (i-stérol VI), augmente V : (facteur de multiplication de 2 à 4).

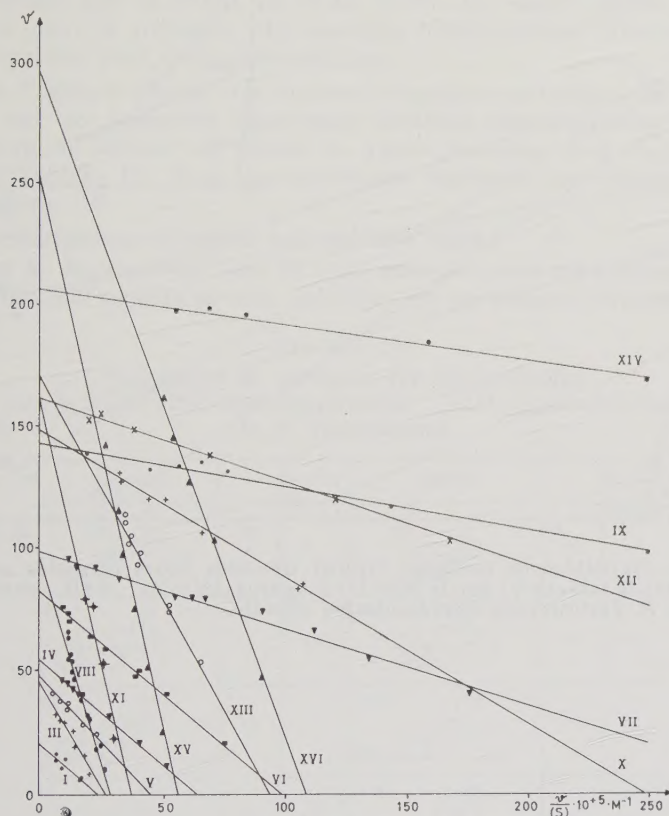


FIG. 1. — Oxydation de quelques 17 β -OH stéroïdes (leurs formules sont données dans le tableau II) par la 3(ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *P. Testosteroni*. Représentation d'Eadie.

L'effet d'accélération est plus fort lorsque la double liaison participe au noyau B (stéroïls X et XI : facteur de multiplication de 7 à 8). L'effet observé est donc dans tous les cas comparable à celui déjà rapporté par TALALAY [4, 5, 6] pour l'introduction d'une fonction $C = O$ en C_3 . Toutefois, ces 3-oxo stéroïdes donnent une inhibition par excès de substrat, même après introduction d'une double liaison en 4,5. Par contre, une liaison 1,2 rétablit une courbe michaelienne (stérol VII). Il est à remarquer que la V du 3-oxo 17 β -hydroxy(5 α) androstane n'est que très peu modifiée par addition d'une ou deux doubles liaisons sur le noyau A.

3. La V d'oxydation est considérablement accrue par introduction d'un groupement électro-négatif en C₃. Comparer les stérols XI, XV et XVI.

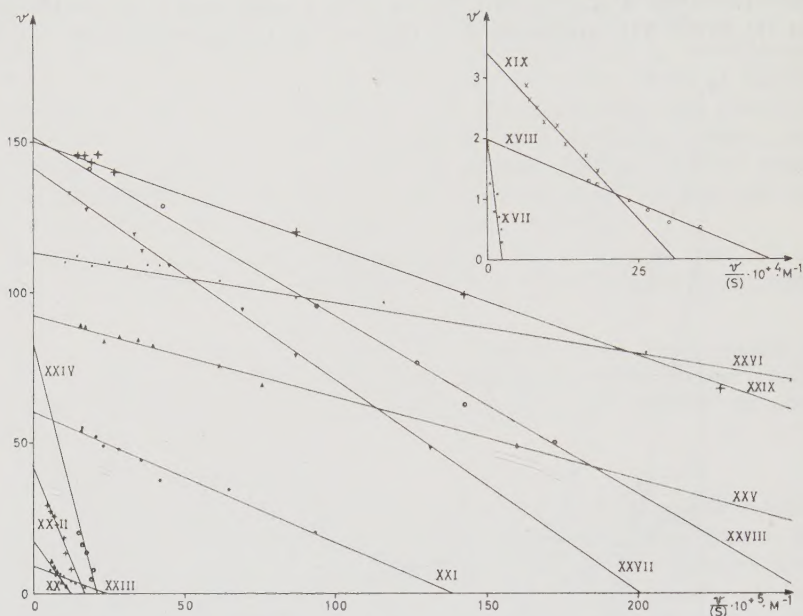


FIG. 2. — Oxydation de quelques 17 β -OH stérols (leurs formules sont données dans le tableau V) par la 3(ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD : oxydoréductase de *P. Testosteroni*. Représentation d'Eadie.

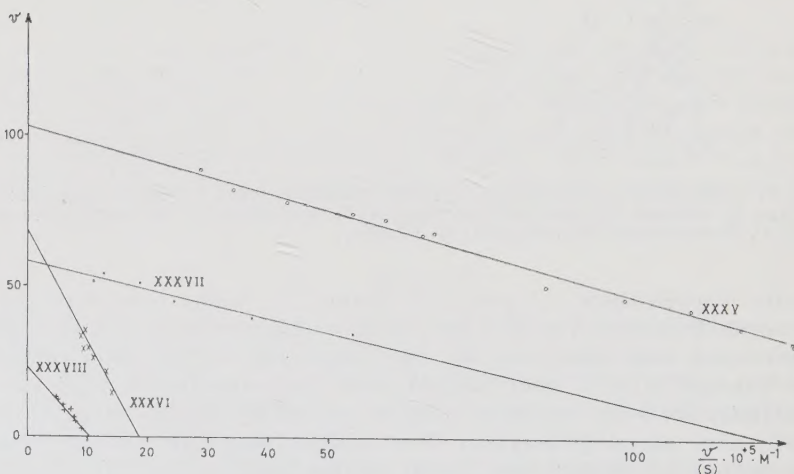


FIG. 3. — Oxydation de quelques 17 β -OH stérols (leurs formules sont données dans le tableau V) par la 3(ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *P. Testosteroni*. Représentation d'Eadie.

4. La structure aromatique du noyau A constitue un problème particulier. L'introduction en C₃ d'un OH diminue V ($V = 13$ contre $V \approx 300$, calculé d'après TALALAY [4] pour le 17 β -hydroxy-estra-1,3,5(10)-triène). Cette diminution est en relation avec le caractère acide de ce groupement très polaire puisque des valeurs plus élevées sont obtenues lorsque H est remplacé par Cl (VIII) ou OCH₃ (XIV). La valeur élevée de la V observée pour la structure XII, analogue hétérocyclique d'un estrogène est compatible avec cette interprétation.

B. La Figure 2 groupe des mesures cinétiques effectuées sur des stérols et sur des composés apparentés différant essentiellement par leur dimension au niveau du noyau A. Leurs formules sont représentées dans le Tableau III. Tous ces stérols ont également des cinétiques michaéliennes.

Les constatations suivantes peuvent être faites :

1. Les A- des stéroïdes sont de bons substrats pour cet enzyme (XXVII et XXVIII). La rigidité de leur structure est un élément important puis-

TABLEAU III.

*Oxydation de quelques 17 β -OH stéroïdes
par la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase
de P. Testosteroni.*

SUBSTRAT	V	Km. 10 ⁻⁵ M	SUBSTRAT	V	Km. 10 ⁻⁵ M
XVII 	2	9	XXIV 	82	3,7
XVIII 	2	0,4	XXV 	92	0,3
XIX 	3,4	1	XXVI 	113	0,2
XX 	17	1,4	XXVII 	141	0,7
XXI 	60	0,4	XXVIII 	151	0,6
XXII 	41	2,6	XXIX 	150	0,4
XXIII 	9	0,7			

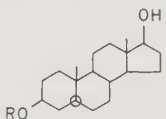
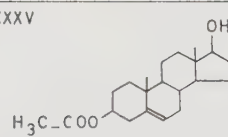
Les stérols XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, ont été solubilisés dans le sérum albumine comme indiqué dans le texte.

que le composé XVII à structure flexible, a une V très faible du même ordre que celle des 1-hydroxy-hydrindane étudiés par TALALAY [7], bien que cette structure présente de grandes analogies avec les stérols XXVII et XXVIII.

2. L'addition d'un cycle surnuméraire au noyau A entraîne une diminution très importante de V lorsque la structure ainsi réalisée est plane et rigide (XVIII et XIX) malgré la présence d'un grand nombre de groupements polaires. Par contre, une structure telle que XXV, non plane et flexible conserve une valeur convenable pour la V malgré l'apport d'un hétérocycle supplémentaire.

TABLEAU IV.

Oxydation de quelques 17 β -OH stéroïdes par la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de P. Testosteroni. Influence de la longueur de la chaîne carbonée en 3 β sur V et K_m .

 $R: H_3C-(CH_2)_n-CO-$		
SUBSTRAT	V	$K_m. 10^{-5} M$
XXXV 	103	0,6
XXXVI $n = 1$	68	3
XXXVII $n = 2$	58	0,5
XXXVIII $n = 4$	23	2
XXXIX $n = 6$	< 1	—
XXXX $n = 16$	0	

Tous ces stéroïdes ont été solubilisés dans la sérum albumine comme indiqué dans le texte.

3. L'addition d'une chaîne aliphatique flexible sur C_3 ne modifie pas ou très peu la V lorsque cette chaîne n'excède pas certaines limites. Ainsi, le stérol XXI a une V très comparable au stérol III et le stérol XX une V comparable au stérol I. Dans le but de préciser quelle était la limite de longueur de chaîne acceptable par l'enzyme, nous avons étudié les V

d'un groupe de dérivés 3 β -acyloxy du 3,17-dihydroxy(5 α) androstane. La Fig. 3 montre que les courbes sont michaeliennes et le tableau IV indique que la V devient pratiquement nulle lorsque la longueur de chaîne, y compris l'oxygène est de 9 éléments (stérol XXXIV).

4. Par contre, des modifications importantes de la jonction A/B et en particulier la présence d'un 5 β -méthyl diminue considérablement la V même lorsque la structure porte un atome de fluor (Cf. stérols XXII et XXIII).

On observe sur le Tableau III un autre exemple d'un effet d'accélération de l'introduction d'une double liaison sur le noyau A (comparer XXVI et XXIX).

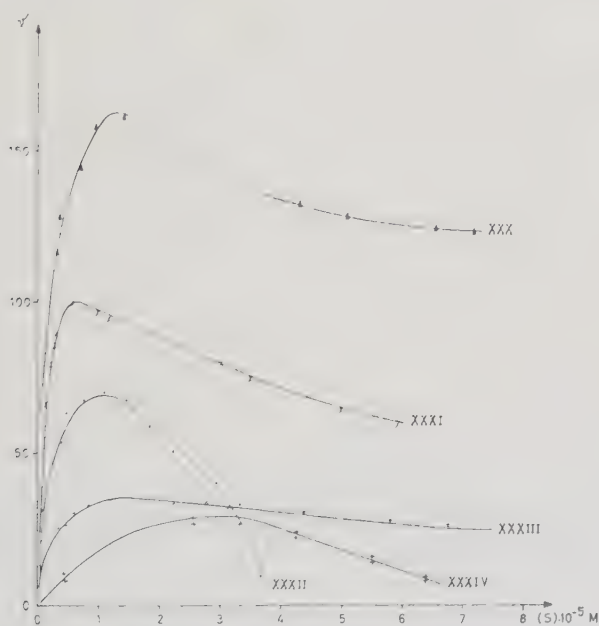


FIG. 4. — Oxydation de quelques 17 β -OH stéroïdes (leurs formules sont données dans le tableau V) par la 3(ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *P. Testosteroni*. Tous ces stéroïdes donnent une inhibition par excès de substrat.

C. Les Fig. 4 et 5 et le Tableau V groupent les résultats obtenus avec plusieurs stéroïdes pour lesquels a spécialement été recherché l'effet d'inhibition par excès de substrat. Leur étude a été abordée dans le but de préciser quelles étaient les relations existant entre le nombre et la position des doubles liaisons C-C (en particulier leur conjugaison avec le carbonyle) et ce phénomène d'inhibition observé par TALALAY pour les 3-oxo (5 α et β) stéroïdes. Nos résultats montrent que l'inhibition est

retrouvée pour tous les substrats étudiés. Il faut cependant observer qu'aux faibles concentrations en substrat, la loi de Michaelis est suivie. Aux fortes concentrations en substrat, l'inhibition atteint 90 p. 100 pour $[S] = 4.10^{-5}$ M avec le stérol XXXII qui présente une structure plane et trois doubles liaisons conjuguées avec le carbonyle (comparer avec le stérol XXXIV). Il est difficile pour l'instant de trouver une relation entre l'intensité du phénomène d'inhibition observé et les différentes



FIG. 5. — Oxydation de quelques 17β -OH stéroïdes (leurs formules sont données dans le tableau V) par la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *P. Testosteroni*. (Représentation d'Eadie). Tous ces stéroïdes donnent une inhibition par excès de substrat.

structures. Par contre, rappelons que l'addition d'une double liaison 1,2 supprime l'inhibition par excès de substrat (comparer les stéroïdes XXXI et VII).

III. — DISCUSSION.

Dans l'interprétation des résultats, V ne doit pas seul être pris en considération : une V faible peut en effet caractériser un mauvais substrat, tout comme un trop bon substrat trop fortement lié à l'enzyme.

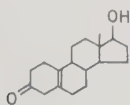
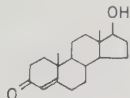
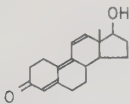
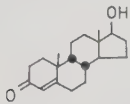
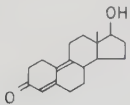
K_m qui représente en première approximation l'affinité du complexe enzyme-coenzyme pour le substrat, peut permettre de lever cette indétermination.

La première éventualité est probablement rencontrée avec le stérol I pour lequel la V faible est vraisemblablement due au caractère fortement hydrophobe du reste de la molécule, puisque cette V croît par addition de groupements polaires. La valeur relativement élevée de K_m est compatible avec cette hypothèse.

La deuxième possibilité est observée avec l'estradiol II pour lequel la valeur faible de V observée peut être attribuée à la trop grande polarité de la structure phénolique, puisque des V plus grandes sont observées lorsque le groupement phénolique est supprimé ou méthoxylé.

TABLEAU V.

Oxydation par la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de P. Testostéroni de quelques 17 β -OH stéroïdes donnant une inhibition par excès de substrat.

SUBSTRATS	V	$K_m \cdot 10^{-5} \text{ M}$
XXX 	184	0,2
XXXI 	120	0,1
XXXII 	84	0,2
XXXIII 	42	0,2
XXXIV 	53	1,4

On observe d'ailleurs que K_m prend les valeurs les plus faibles ($\leq 0,3 \cdot 10^{-5}$) pour des substrats possédant un noyau A (ou analogue) riche en électrons π : ceci permet de supposer que l'affinité des substrats pour l'enzyme est fortement sous la dépendance de la structure du noyau A.

Ainsi, en dépit de telles difficultés d'interprétation, nous pouvons néanmoins conclure de l'analyse des résultats du Tableau II que l'introduction d'un groupement polaire au niveau du noyau A augmente V .

D'autre part, les résultats groupés dans le Tableau III donnent quelques indications sur les possibilités « d'adaptation » de la conformation de l'enzyme, selon KOSHLAND [28], aux dimensions du substrat. Cet enzyme peut accepter des substrats de dimensions plus réduites que le noyau gonane à condition toutefois qu'ils aient une structure *rigide* ; tels sont les A- des stéroïdes XXVII et XXVIII. A l'opposé, cet enzyme peut accepter des substrats plus volumineux que le noyau gonane, mais dans certaines limites. Nous pensons pouvoir conclure de ces résultats qu'un « bon substrat » pour cet enzyme doit avoir :

1. un ou plusieurs groupements polaires à une distance suffisante de l'hydroxyle en 17. D'après les modèles DREIDING [29] elle serait de 11 Å pour les stéroïdes normaux à 8 Å pour les substrats tricycliques.

2. Ces groupements polaires doivent être maintenus à cette distance par la *rigidité* de la structure polycyclique.

3. Les dimensions du substrat ne peuvent excéder certaines limites : des substitutions sur le noyau A diminuent V. Cet effet est total avec un cycle surnuméraire malgré les groupements polaires qu'il introduit.

Une certaine latitude existe encore pour les substitutions aliphatiques (jusqu'à 9 éléments) par suite de la flexibilité de la chaîne.

Ces résultats permettent-ils de formuler une idée plus précise du site enzymatique par ce procédé d'approche « indirecte » Nous pensons que cela est possible en utilisant les trois principaux points de la théorie formulée par PRELOG et coll. [16, 17] pour le même type d'approche indirecte de la géométrie du site enzymatique du « B » enzyme de *Curvularia Falcata*, actif sur les alcools bi ou tricycliques.

Ces trois points sont :

1. Lorsqu'un substrat lipophile est transformé par un enzyme à NAD, à une vitesse « mesurable », l'espace occupé par l'état de transition ne doit être encombré : ni par un résidu peptidique de l'enzyme, ni par le coenzyme, ni par des ions ou des molécules de solvant ou d'inhibiteur liés à l'enzyme.

2. On suppose que l'état de transition correspond au NADH lié à un groupement carbonyle « ouvert » préfigurant la configuration de l'alcool secondaire.

3. NADH attaque le carbonyle *toujours* par la même face : si l'enzyme est un « B » enzyme [30, 31] et l'alcool formé de type *S* [32] (figure 6) ceci indique que le CONH_2 se présente du côté le *moins encombré* du carbonyle.

Ce dernier point est particulièrement important puisqu'il postule que le substrat doit toujours être *orienté de la même façon* par rapport à la liaison C (carbone porteur d'oxygène) $\longrightarrow$ H (porté par le C_4 du NADH) ou, ce qui revient au même, par rapport à la liaison C $\longrightarrow$ OH.

La superposition des structures de ces différents substrats sur cet axe conduit ainsi à une sorte de modèle, d'empreinte, du site enzymatique :

les « mauvais substrats » sont alors ceux dont les dimensions excèdent celles du modèle, par suite de la présence de quelque partie de la molécule dans des « régions interdites ».

FIGURE 6a

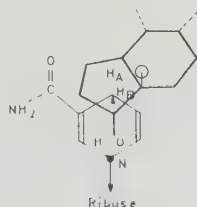


FIGURE 6b

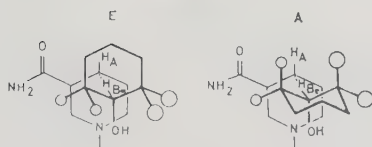


FIG. 6 a. — Attaque en C_{17} par H_8 du nicotinamide du NADH (17 β -stérol de configuration S , attaqué par le β -enzyme).

FIG. 6 b. — Formation d'un S alcool par un B-enzyme selon PRELOG. E : S-OH équatorial. A : S-OH axial.

Dans le travail de PRELOG, les substrats sont des composés polycycliques de conformation chaise : leurs superpositions conduisent évidemment à des sections du réseau du diamant.

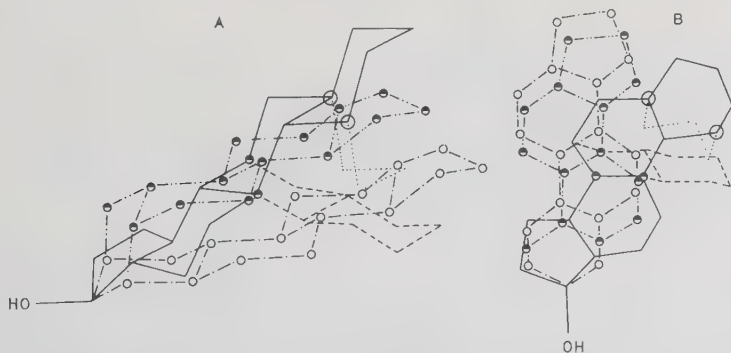


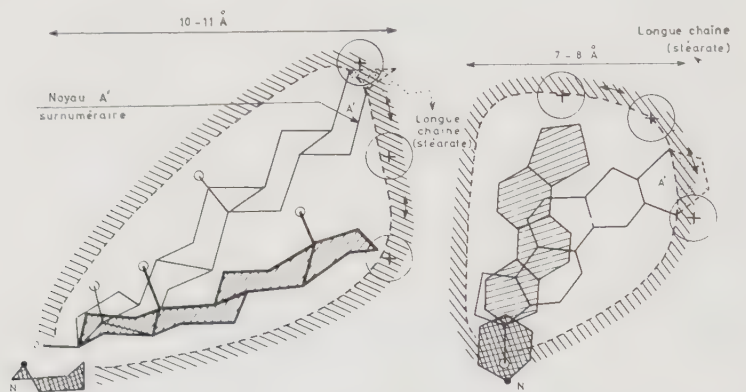
FIG. 7. — Superposition des principaux types de substrats 3 β et 17 β hydroxylés de la β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *Pseudomonas Testostérone*.

A : vue latérale droite.

B : vue de dessus (face β).

Dans notre cas rien ne paraît pouvoir interdire l'extension de cette théorie aux 3 β -hydroxy (déjà mentionnés par TALALAY) et 17 β -hydroxy stéroïdes considérés alors comme des cyclopentanolis substitués.

La superposition des divers squelettes rencontrés dans les « bons substrats » (Fig. 7) permet de donner une représentation « théorique » du site enzymatique (Fig. 8).



Essai de représentation du site actif de la 3 β (17 β) hydroxy stéroïde NAD oxydo réductase de *P. Testostéroni*.



Fig. 8. — Essai de représentation du site actif de la 3 (ou 17)- β -hydroxystéroïde: NAD oxydoréductase de *P. Testostéroni*.

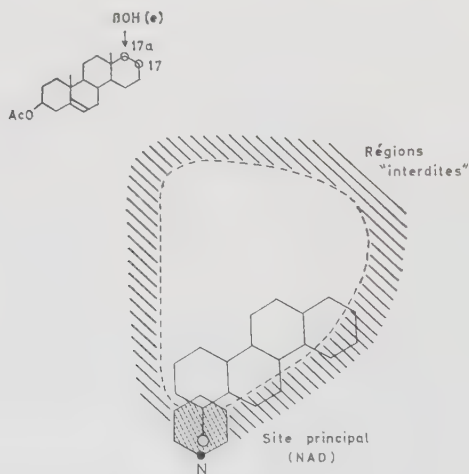


Fig. 9. — Position du 3 β -acétoxy 17a β -hydroxy D-homo androsta-5-ène.

Trois éléments sont à retenir dans l'examen de ce modèle :

1. *Les dimensions du site* : tout substrat excédant ces dimensions sera un mauvais substrat, mais un substrat trop petit sera également un mauvais substrat, car il ne pourra être « fixé » correctement par suite de multiples possibilités d'orientations, le « moule » enzymatique étant trop volumineux pour lui.

2. *La participation* (hypothétique) de « sites secondaires » fixant la molécule en bonne position, par liaison avec des régions polaires du noyau A ou B.

3. La « géométrie » de ce site qui met en évidence des *régions interdites* permet ainsi de faire des prévisions sur la vitesse d'oxydation d'un substrat.

Nous avons précisément pu vérifier l'intérêt d'une telle représentation théorique : le 3 β -acétoxy 17 α β -hydroxy D-homo androsta-5-ène doit avoir une *V* très faible puisqu'une grande partie du squelette stéroïdien est dans la région interdite (Cf. Fig. 9). Nous avons trouvé, en effet, $V = 0$ dans les conditions expérimentales classiques de dosage.

L'intérêt d'un tel modèle paraît donc certain. Toutefois, nous voulons attirer l'attention sur le fait qu'un tel schéma est purement théorique et rien d'autre. Il ne fait appel à aucune considération sur la conformation réelle du nicotinamide du NADH dans le complexe de transition (conformation en « feuillet de livre » (LEVY et VENNESLAND [33]) ou plane (MEYER et coll. [34]) pas plus qu'à l'éventuelle participation d'un résidu d'histidine (RINGOLD [35]) ou même de tryptophane (SCHELLENBERG [36, 37]) au cours du processus de réduction.

Tel quel, malgré ses imperfections certaines, nous pensons toutefois qu'un tel modèle sera utile d'une part en orientant des recherches sur certaines structures analogues aux stéroïdes et d'autre part, comme base d'interprétation d'études cinétiques sur d'autres hydroxystéroïdes: NAD oxydoréductases.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Messieurs les Professeurs Z. CEKAN (1) (Institut de Recherches des substances naturelles, Prague), DE BRUYN (2) Laboratoire Philips — Duphar Weeps, Pays-Bas, A. HOREAU (3), J. JACQUES et H. KAGAN (Laboratoire de chimie organique des Hormones, Collège de France, Paris), Madame MOUSSERON-CANET (4) (Laboratoire de chimie organique, ENSC Montpellier), G. OURRISSON (5) et M. BLOCH (Laboratoire de chimie organique, ENSC Strasbourg) et L. VELLUZ (6) (Laboratoire Roussel-UCLAF, Paris), pour nous avoir fourni les stéroïdes ci-après :

1. XXV.

2. XXXIII.

3. XX, XXI, XXVI, XXIX.

4. X, XV, XVI, XXII, XXIII, XXX.

Ces stéroïdes ont été pour la plupart synthétisés dans le cadre de la RCP N° 70.

5. XVIII, XIX, XXIV.

6. II, III, IV, VIII, XII, XVII, XXVII, XXVIII XXXI, XXXII, XXXIV.

Tous les autres stéroïdes utilisés dans ce travail ont été synthétisés dans le laboratoire :

les stéroïdes V, VI, IX, XI, XIII, XIV, XXXV par J. BASCOUL et B. COCTON,

les stéroïdes XXXVI, XXXVII, XXXVIII, XXXIX, XXXX par L. BARDOU.

SUMMARY.

We have studied the action of the 3(or 17)- β -hydroxysteroid : NAD oxydoreductase of *Pseudomonas Testosteroni* on a group of 17 β -hydroxylated steroids and on some polycyclic products : all these substrates have been chosen so that the immediate environment of the secondary alcoholic function oxidized by the enzymes is the same as the one of the C-D transhydrindane junction of testosterone ; this condition permits to study the effect of the kinetics of oxidation (characterised by the maximal speed V and by Km) on the modified structures remote from oxidized function for example on the A or B cycle.

Two groups of experimental facts have been demonstrated :

— in the absence of polar or function group on the cycle A, the oxidation in C₁₇ is very slow. It is known, since the work of TALALAY, that the speed of reaction is greater when the cycle A bears a carbonyl function ; our results show that in a more general way, an acceleration effect is obtained when the cycle A has a or function polar group ($-\text{C}=\text{C}-$, i-sterol, $-\text{C}-\text{Cl}$, $-\text{C}-\text{F}$).

— The increase of the substrate dimensions on the cycle A brings a progressively decrease of V which drops to zero for instance when a long flexible chain of 9 atoms is substituted on C₃, or when a rigid cycle is attached on C₂-C₃ ; this fact is observed even when the molecule carries many polar groups on the cycle A and on the extra cycle.

However, the enzyme is quite adaptable to tricyclic substrates such as the « A- des steroids » which are excellent substrates.

We have tried to extend to this kind of enzyme and substrates the theory proposed by PRELOG for analysing and explaining the stereospecific action of fongic or tissular oxydoreductases on alcohols of mono, bi or tricyclic ketones.

The superposition on the C₁₇-OH bond of all the substrates which are oxidized at a rate higher than or equivalent to the one of the 17 β -hydroxy (5 α) androstane, leads to a « cast » of the enzymatic site.

This indirect analytic procedure of the enzymatic site permits the evaluation of its dimensions, suggests the participation of secondary sites of attachment of the molecule by linking through the polar zones of the A cycle and determines an orientation of this site which shows « forbidden zones ».

The theoretical model of the enzymatic sites allows satisfactory forecast on the rapidity of oxidation of a substrate.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung der 3 (oder 17) β Hydroxysteroid : NAD oxydoreduktase aus *Pseudomonas testosteroni* auf etliche 17 β Hydroxylsteroid und Polycyclanderivate wurde erforscht : alle Substrate wurden nach dem Kriterium einer möglichst identischen Struktur in der Umgebung der sekundären Alkoholfunktion, in Bezug auf den C-D Transhydrindan Ringschluss des Testosterons ausgewählt. Diese Bedingung erlaubt es, den Einfluss von, in Bezug auf die oxydierte Funktion entfernten Strukturveränderungen (z.B. am A oder B Ring), auf die Oxydationskinetik, welche durch die Höchstgeschwindigkeit V sowie Km ausgedrückt wird, zu erforschen.

Zwei Gruppen von experimentellen Ergebnissen wurden erhalten ; in Abwesenheit von polaren Funktionen oder Gruppen am A-Ring verläuft die Oxydation auf C-17 sehr langsam. Seit TALALAY weiss man, dass diese Geschwindigkeit mit der Anwesenheit einer Carbonylfunktion auf A wächst. Die erhaltenen Resultate beweisen jedoch, dass eine solche Beschleunigung ganz allgemein polaren Funktionen oder Gruppen auf A ($-\text{C}=\text{C}-$, i-Sterol, $-\text{C}-\text{Cl}-$, $-\text{C}-\text{F}-$) zuzuschreiben ist.

Mit wachsender Geräumigkeit des Substrates am A-Ring, nimmt V fortschreitend ab und erreicht den Nullwert wenn entweder eine lange, *biegsame*

Kohlenstoffkette von 9 Atomen auf C3 angehaftet, oder auch ein neuer, starrer Ring auf C2-C3 geschlossen wird, und dies sogar wenn das Molekül zahlreiche polare Gruppen auf dem A Ring oder dem zusätzlichen Ring trägt.

Hingegen passt sich das Enzym tadellos an Dreiringstrukturen an : die A-des-Steroide sind ausgezeichnete Substrate.

Es wurde versucht, auf diesen Typus von Enzymen und Substraten die Prelog'sche Theorie der Analyse und Erklärung stereospezifischer Wirkungen von Pilz- oder Gewebsoxydoreduktasen auf Mono-, Bi- oder Tricyclische Alkohole und Ketone zu verallgemeinern.

Die Ueberlagerung sämtlicher Substrate an der C17-OH Bindung, falls die Oxydationsgeschwindigkeit dieser Substrate der des 17- β -Hydroxy (5 α) Androstans gleich oder überlegen ist, erlaubt es, einen « Abdruck » des enzymatischen Wirkungslocus zu erhalten. Diese indirekte Analyse des Wirkungslokus ermöglicht es, seine Dimensionen zu erschätzen, auf Mitwirkung von « sekundären » Strukturen, welche polare Gruppen am A Ring binden, zu schliessen und eine « Orientierung » festzustellen die den Ausschluss gewisser Enzymgebiete angibt.

Dieses theoretische Modell des enzymaktiven Lokus ermöglicht es, befriedigende Vorangaben der Oxydationsgeschwindigkeit von Substraten abschätzen zu können.

BIBLIOGRAPHIE.

1. LEVY, H. R., TALALAY, P., VENNESLAND, B. — *Progress in Stereochemistry*, 1962, 3, chap. 8, Butterworth, London.
2. TALALAY, P. — *Annual Review Biochem.*, 1965, 34, 347.
3. TALALAY, P., DOBSON, M. M. — *J. Biol. Chem.*, 1953, 205, 823.
4. MARCUS, P. I., TALALAY, P. — *Proc. Roy. Soc. London*, Ser. B, 1955, 144, 116.
5. TALALAY, P., MARCUS, P. I. — *J. Biol. Chem.*, 1956, 218, 675.
6. TALALAY, P. — *Record Chem. Progr.*, 1957, 18, 31.
7. TALALAY, P., LEVY, H. R. — *Ciba Foundation Study Group*, N° 2, 1958, 53.
8. RINGOLD, H. J., GRAVES, J., HAYANO, M., LAWRENCE, M. Jr. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 13, 162.
9. GRAVES, J. M. H., CLARK, A., RINGOLD, M. J. — *Biochemistry*, 1965, 4, 2655.
10. RINGOLD, H. J., GRAVES, J. M. H., CLARK, A., BELLAS, T. — *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, 1966, 56, 255.
11. WALLER, G., THEORELL, H., SJOVALL, J. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1965, 111, 671.
12. ACKLIN, W. — *Diss. ETH, Zürich*, Prom. Nr., 2840 (1958).
13. WALTER, P. — *Diss. ETH, Zürich*, Prom. Nr. 3084 (1960).
14. SCHENKER, F. — *Diss. ETH, Zürich*, Prom. Nr. 3106 (1960).
15. SERDAREVIC, B. — *Diss. ETH, Zürich*, Prom. Nr. 3145 (1960).
16. RETEY, J. — *Diss. ETH, Zürich*, Prom. Nr. 3409 (1963).
17. PRELOG, V. — *Pure Appl. Chem.*, 1864, 9, 119.
18. ACKLIN, W., PRELOG, V., SHENKER, F., SERDAREVIC, B., WALTER, P. — *Helv. Chem. Acta*, 1965, 48, 1725.
19. TALALAY, P. — *Method Biochem. Anal.*, 1960, 8, 119.
20. TALALAY, P. — *The enzymes*, Vol. VII, N. Y., Acad. Press Inc., 1963, p. 177.
21. LANGER, L. J., ALEXANDER, J. A., ENGEL, L. L. — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 2609.
22. ADAMS, J. A., JARABAK, J., TALALAY, P. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 3069.
23. DELIN, S., SQUIRE, P. H., PORATH, J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 89, 398.
24. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
25. HURLOCK, B., TALALAY, P. — *J. Biol. Chem.*, 1957, 227, 37.
26. HORECKER, B. L., HORNBERG, A. J. — *J. Biol. Chem.*, 1948, 175, 385.
27. EADIE, G. S., BERNHEIM, F., BERNHEIM, M. L. C. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 181, 449.
28. KOSHLAND, D. E. Jr. — *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, 1958, 44, 98.
29. BUCHI, W. — *Glasapparatefabrik Flawil*, Zürich, Switzerland
30. TALALAY, P., LOEWUS, F. A., VENNESLAND, B. — *J. Biol. Chem.*, 1955, 212, 801.
31. CORNFORTH, J. W., RYBACK, G., POPJAK, G., DONNINGER, C., SCHROEPPER, G. J. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1962, 9, 371.
32. CAHN, R. S., INGOLD, C. K., PRELOG, V. — *Experientia*, 1956, 12, 81.

33. LEVY, H. R., VENNESLAND, B. — *J. Biol. Chem.*, 1957, **228**, 85.
34. MEYER, W. L., MAHLER, H. R., BAKER, R. H. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **64**, 353.
35. RINGOLD, H. J. — *Nature*, 1966, **210**, 535.
36. SCHELLENBERG, K. A. — *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 2446.
37. SCHELLENBERG, K. A., McLEAN, G. W. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 1077.
38. PEARLMAN, W. H., CREPY, O. — *J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 182.

Printed in France.